

III Seminário de Investigação Aplicada em Farmácia Auditório da ESTeSL

Trabalho realizado no âmbito do 4.º ano da Licenciatura em Farmácia,
ano letivo 2020/2021

Determination of azole resistance in *Camelia sinensis* (L.) Kuntze green tea

Mariana Faria¹, Marta Dias^{1,2}, Liliana Aranha Caetano^{1,3*}

¹ Health & Technology Research Center, Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa;

² Comprehensive Health Research Center, NOVA National School of Public Health, Universidade NOVA de Lisboa;

³ Research Institute for Medicines, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon

Agradecimentos: Instituto Politécnico de Lisboa, pelo financiamento do projeto "*Resistant mycobiota and mycotoxigenic profile of tea and medicinal plants*" (IPL/2020/TEAResMyc_ESTeSL), e FCT/MCTES – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P. (UIDB/05608/2020) (Bolsa Ph.D UI/BD/151431/2021)

 * liliana.caetano@estesl.ipl.pt

Pertinência do estudo

- A taxa mundial de consumo de infusões de chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) tem vindo a aumentar em todo o mundo, devido às suas propriedades promotoras de saúde e a tendências de estilo de vida saudável.

O consumo destas pode, representar uma fonte de exposição a contaminantes biológicos, como fungos resistentes, bactérias e micotoxinas.

Os antimicrobianos azólicos, eficazes contra fungos patogénicos, são amplamente usados em:

Tratamento de infeções fúngicas

Aspergillus fumigatus

(responsável por 300.000 infeções com risco de vida anualmente em hospedeiros humanos suscetíveis)

Agricultura

Produção de chá

A emergência na última década de casos de **resistência fúngica a antifúngicos azólicos** na Europa e a nível mundial envolvendo estirpes de *Aspergillus fumigatus* de ambientes clínicos e agrícolas, sugere que a resistência clínica aos azóis poderá ter, em parte, origem agrícola (1).

Por outro lado, a exposição por **ingestão de géneros alimentícios contaminados** com microorganismos patogénicos apresenta riscos conhecidos para a saúde, sendo uma dificuldade a sua monitorização e controlo por ausência de níveis máximos estabelecidos para a maioria destes.

Objetivos

GERAL

- Avaliar a carga biológica (bactérias e fungos) de amostras de extração e infusão de chá verde, comercializados na área metropolitana de Lisboa e obter uma caracterização da carga fúngica mais refinada, incluindo o perfil de resistência aos azóis.

ESPECÍFICOS

- Quantificar o microbiota presente nas amostras de chá verde.
- Identificar o micobiota presente nas amostras de chá verde obtidas através de características macroscópicas e microscópicas.
- Determinar o perfil de resistência dos fungos aos antifúngicos do grupo dos azóis.

Materiais e Métodos: Caracterização da amostra

Amostragem em diferentes superfícies comerciais da Área Metropolitana de Lisboa que comercializam chá verde:

- 1 supermercado
- 1 ervanária

Type	Production	Origin	Packaging
green	conventional	China	bulk
green	biological	Azores	bulk
green	biological	Azores	tea bags
green	biological	EU	tea bags
green	biological	EU	bulk
green	biological	Portugal	bulk
green	conventional	EU	tea bags
green	biological	Espanha	tea bags
green	n.d.	n.d.	powder tea bags
green	conventional	EU	tea bags
green	conventional	Germany	tea bags
green	biological	China	bulk
green	n.d.	n.d.	tea bags
green	n.d.	n.d.	tea bags
green	conventional	n.d.	tea bags
green	conventional	Portugal	tea bags
green	conventional	Portugal	tea bags

Tabela 1 – Características das 17 amostras recolhidas.

Materiais e Métodos: Infusão de chá verde

Avaliação microbiológica quantitativa (bactérias e fungos) e qualitativa (fungos).



- 1g de chá em 50 mL de água fervente por 5 minutos;
- 10 mL da infusão filtrados



Figura 1 – Preparação da infusão de chá verde.

Materiais e Métodos: Extração de chá verde



- 4,4 g de chá extraídos com 40 mL de solução NaCl 0,9% + Tween 80 0,05%
- agitação por 30 minutos (Orbital Shaker - OHAUS®)
- 10 mL dos extratos filtrados

Materiais e Métodos: Preparação de meios de cultura



- Meios de cultura seletivos
 - Bactérias: *Tryptic Soy Agar* (TSA), *Red Bile Agar* (RB)
 - Fungos: *Malt Extract Agar* (MEA), *Dichloran Glycerol* (DG18), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)
- Triagem de resistências aos azóis
 - SDA suplementado com
 - 4 mg.L⁻¹ Itraconazol
 - 2 mg.L⁻¹ Voriconazol
 - 0,5 mg.L⁻¹ Posaconazol



Figura 2 – Preparação dos meios de cultura em placas de Petri de 90 mm em câmara de fluxo de ar laminar vertical (CFALV).

Materiais e Métodos: Inoculação e incubação dos meios



- Inoculação de 150 μl de amostra nos 8 meios de cultura (TSA, RB, MEA, DG18, SDA e SDA com 4 mg.L^{-1} ITR, 2 mg.L^{-1} VOR, 0,5 mg.L^{-1} POS);
- Incubação das placas inoculadas:
 - TSA e RB: 7 dias a 30 °C
 - MEA e DG18: 6 dias a 25 °C
 - SDA com azóis: 3-4 dias a 25 °C

Materiais e Métodos: Quantificação do microbiota



- Contagem visual de bactérias ao 3.º, 5.º e 7.º dias de incubação.
- Colónias de fungos agrupadas com base nas características organoléticas e contadas no fim do período de incubação:
 - DG18 e MEA - ao 6.º dia
 - SDA e SDA suplementado com azóis – ao 4.º dia
- Identificação e preparação de lâminas consoante o número de colónias de fungos com solução de lactofenol, em esterilidade (na CFALV)



Figura 3 – Contagem de bactérias

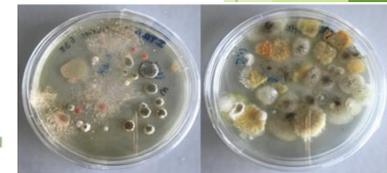


Figura 4 – Contagem de fungos e Preparação das lâminas para identificação microscópica

Materiais e Métodos: Caracterização do micobiota

Infusão do chá verde

Extração do chá verde

Preparação do meio de cultura

Inoculação e Incubação

Contagem de bactérias e fungos e
Preparação das lâminas

Identificação fúngica

- Identificação microscópica dos fungos

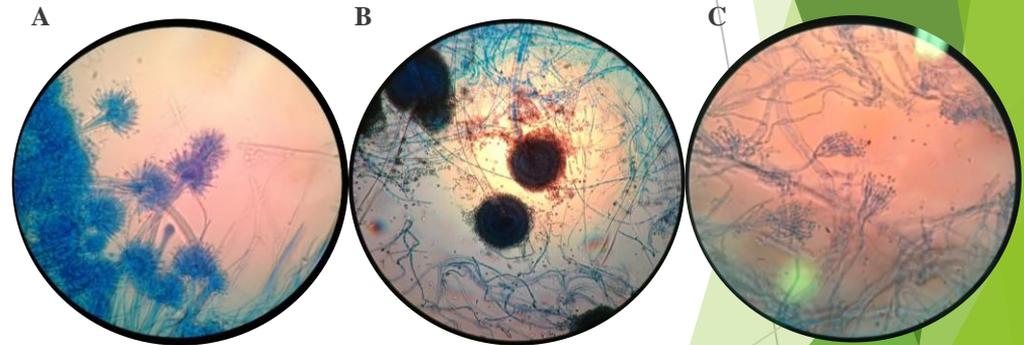


Figura 5 – Identificação de fungos com microscópio (ampliação 40x). A, *Aspergillus* seção *Nidulantes*; B, *Aspergillus* seção *Nigri*; C, *Penicillium* sp.

Resultados: Quantificação do microbiota

Sample	Extraction		Infusion	
	TSA (CFU.g ⁻¹)	RB (CFU.g ⁻¹)	TSA (CFU.g ⁻¹)	RB (CFU.g ⁻¹)
1	1575.8	0.0	2000.0	0.0
2	363.6	0.0	2000.0	0.0
3	22060.6	0.0	1000.0	0.0
4	363.6	60.6	2000.0	0.0
5	60.6	0.0	1333,3	0.0
6	363.6	0.0	2000.0	0.0
7	363.6	0.0	2000.0	0.0
8	363.6	121.2	6333,3	0.0
9	363.6	0.0	2000.0	0.0
10	363.6	121.2	2000.0	666,7
11	363.6	60.6	2000.0	0.0
12	363.6	0.0	2000.0	0.0
13	363.6	0.0	4000.0	0.0
14	363.6	0.0	6666,7	0.0
15	363.6	0.0	2000.0	0.0
16	121.2	0.0	4666,7	0.0
17	363.6	0.0	2000.0	0.0

Tabela 2 – Quantificação total das bactérias.

Sample	Extraction		Infusion	
	MEA (CFU.g ⁻¹)	DG18 (CFU.g ⁻¹)	MEA (CFU.g ⁻¹)	DG18 (CFU.g ⁻¹)
1	60.6	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	333.3	0.0
3	0.0	0.0	0.0	0.0
4	424.2	0.0	666.7	333.3
5	181.8	121.2	666.7	333.3
6	60.6	0.0	333.3	333.3
7	787.9	1757.6	333.3	0.0
8	484.8	606.1	333.3	0.0
9	60.6	121.2	666.7	0.0
10	1818.2	2606.1	333.3	0.0
11	181.8	484.8	333.3	1000.0
12	121.2	60.6	1000.0	666.7
13	242.4	424.2	0.0	0.0
14	242.4	242.4	333.3	666.7
15	4848.5	4060.6	333.3	22333.3
16	303.0	606.1	333.3	666.7
17	303.0	303.0	666.7	0.0

Tabela 3 – Quantificação total dos fungos.

- A contaminação bacteriana e fúngica no chá verde (extração e infusão) foi maior neste estudo em comparação a estudos anteriores (4,5,6).
- Risco de presença de esporos de bactérias e fungos viáveis à temperatura de ebulição da água (100 °C) i.e., através do consumo de infusões de chá verde (5).

4 - Viegas C, Sá F, Mateus M, Santos P, Almeida B, Aranha Caetano L, et al. Commercial green tea from Portugal: Comprehensive microbiologic analyses. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2020;333(July):108795.

5 - Dayananda KRTLK, Fernando KMEP, Perera S. Assessment of Microbial Contaminations in Dried Tea And Tea Brew. *Int J Pharm Sci Invent ISSN (Online)* [Internet]. 2017;6(10):2319–6718.

6 - Carraturo F, De Castro O, Troisi J, De Luca A, Masucci A, Cennamo P, et al. Comparative assessment of the quality of commercial black and green tea using microbiology analyses. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):1–12.

Resultados: Identificação do micobiota

	MEA			DG18		
	Species	CFU.g ⁻¹	%	Species	CFU.g ⁻¹	%
Extraction	<i>Aspergillus section Nidulantes</i>	181.8	1.8	<i>Cladosporium</i>	121.2	1.1
	<i>Cladosporium</i>	121.2	1.2	<i>Chrysonilia sitophila</i>	606.1	5.3
	<i>Chrysonilia sitophila</i>	787.8	7.8	<i>Penicillium</i>	424.2	3.7
	<i>Penicillium</i>	484.8	4.8	<i>Aspergillus section Nigri</i>	7273.6	64.2
	<i>Aspergillus section Nigri</i>	8302.2	82.0	<i>Mucorales</i>	848,5	7.5
	<i>Geomyces</i>	242,4	2.4	<i>Aspergillus section Circumdati</i>	484,8	4.3
				<i>Aspergillus section Aspergilli</i>	1575,8	13.9
Infusion	<i>Aspergillus section Nidulantes</i>	333.3	4.8	<i>Cladosporium</i>	999.9	21.4
	<i>Cladosporium</i>	1333.2	19.0	<i>Chrysonilia sitophila</i>	2999.7	64.3
	<i>Chrysonilia sitophila</i>	4666.2	66.6	<i>Penicillium</i>	666.6	14.3
	<i>Penicillium</i>	333.3	4.8			
	<i>Aspergillus section Fumigati</i>	333,3	4.8			

Tabela 4 – Identificação do micobiota.

- O número de espécies de fungos foi diferente nas amostras de extração em relação às amostras de infusão.
- De acordo com outros estudos que relataram o uso de água quente na preparação de infusões de chá, como forma de reduzir os riscos microbiológicos (7).

Resultados: Distribuição do micobiota

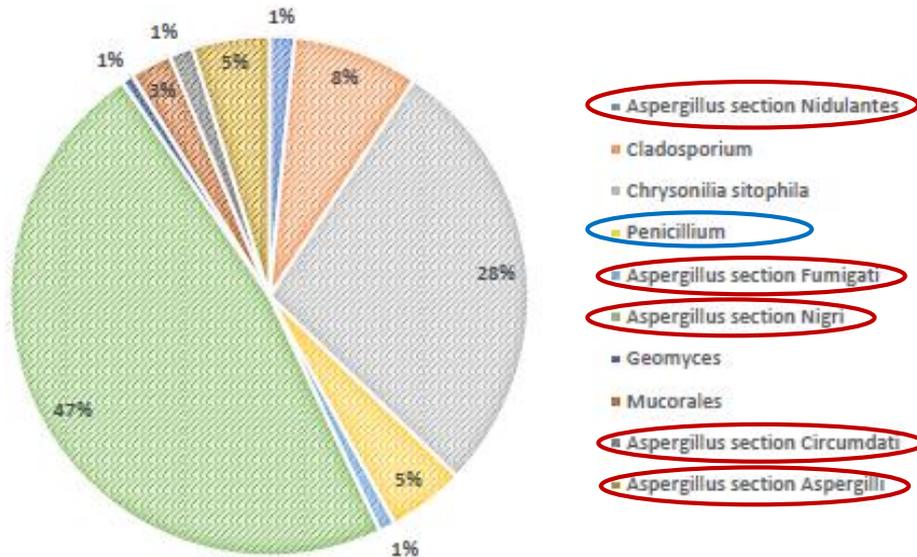


Figura 6– Frequências relativas do micobiota presente nas 17 amostras de chá verde.

- Os géneros toxigénicos mais frequentes identificados foram os *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.
- O risco à saúde humana associado a estas espécies de fungos está na capacidade de estes produzirem micotoxinas, que podem causar uma variedade de efeitos nocivos ao corpo humano, que vão desde respostas alérgicas, imunossupressão e cancro (8,9).

Resultados: Triagem de resistências azólicas

- 21 amostras (14 extração, 7 infusão) com microbiota resistente aos azóis testados.
- Seção *Fumigati* de *Aspergillus* identificada em SDA suplementado com 4 mg.L⁻¹ itraconazol e 2 mg.L⁻¹ voriconazol
 - contrário a estudo anterior que não identificou resistência de *Aspergillus fumigatus* em vegetais (10).
- *Aspergillus* sp. causa uma ampla gama de distúrbios respiratórios, sendo a seção *Fumigati* de *Aspergillus* oportunista de hospedeiros imunocomprometidos e responsável por 90% dos casos de aspergilose invasiva mais grave (11,12). Outras seções de *Aspergillus* (*Nigri*, *Circumdati* e *Aspergilli*) são conhecidas pelo potencial toxigénico (13).

EXTRAÇÃO	ITR		VOR		POS	
	CFU.g ⁻¹	%	CFU.g ⁻¹	%	CFU.g ⁻¹	%
<i>Chrysonilia sitophila</i>	606.1	29.4	121.2	40.0	787.9	92.9
<i>Penicillium</i>	60.6	2.9				
<i>Mucorales</i>	242.4	11.8	181.8	60.0	60.6	7.1
<i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	1151.6	55.9				
TOTAL	2060.7	100.0	303.0	100.0	848.5	100.0

Tabela 5 – Distribuição de espécies de fungos no chá verde (extração) em SDA suplementado com azóis

INFUSÃO	ITR		VOR		POS	
	CFU.g ⁻¹	%	CFU.g ⁻¹	%	CFU.g ⁻¹	%
<i>Chrysonilia sitophila</i>	333.3	33.3	1000.0	60.0	666.6	50.0
<i>Cladosporium</i>	333.3	33.3			666.6	50.0
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	333.3	33.3	333.3	20.0		
<i>Rhizopus</i>			333.3	20.0		
TOTAL	999.9	100.0	1666.6	100.0	1333.2	100.0

Tabela 6 – Distribuição de espécies de fungos no chá verde (infusão) em SDA suplementado com azóis.

10 – van der Torre MH, Whitby C, Eades CP, Moore CB, Novak-Frazier L, Richardson MD, et al. Absence of azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus* isolated from root vegetables harvested from UK arable and horticultural soils. *J Fungi*. 2020;6(4):1–10.

11 – Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol*. 2005;43(SUPPL.1).

12 – Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergilliosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310–50.

13 – Varga J, Baranyi N, Chandrasekaran M, Vágvolgyi C, Kocsubé S. Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biol Szeged*. 2015;59(2):151–67.

Considerações finais

- Chá verde com elevados níveis de contaminação microbiana antes da fervura.
- Contaminação bacteriana maior na infusão, com risco de esporos bacterianos viáveis mesmo após uso de água fervente.
- Menor diversidade fúngica nas amostras de infusão.
- Presença de microbiota em meios suplementados com fármacos azólicos usados no tratamento de infecções fúngicas graves requer investigação adicional.

Recomendação

Controlo microbiológico do chá verde, desde a colheita até à sua comercialização.

Considerações finais



Trabalho em curso:

- Caracterização das micotoxinas presentes no chá verde;
- Extração de DNA fúngico para detecção molecular (por qPCR) de espécies crípticas;
- Determinação das *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) por avaliação da suscetibilidade fúngica aos azóis por ETEST.

III Seminário de Investigação Aplicada em Farmácia Auditório da ESTeSL

Trabalho realizado no âmbito do 4.º ano da Licenciatura em Farmácia,
ano letivo 2020/2021

Determination of azole resistance in *Camelia sinensis* (L.) Kuntze green tea

Mariana Faria¹, Marta Dias^{1,2}, Liliana Aranha Caetano^{1,3*}

Obrigada pela atenção!

Agradecimentos: Instituto Politécnico de Lisboa, pelo financiamento do projeto "*Resistant mycobiota and mycotoxigenic profile of tea and medicinal plants*" (IPL/2020/TEAResMyc_ESTeSL), e FCT/MCTES – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P. (UIDB/05608/2020) (Bolsa Ph.D UI/BD/151431/2021)

✉ * liliana.caetano@estesl.ipl.pt